

УДК 546.719:577.151.4

Ю. С. Воронкова, Н. І. Штеменко

*Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара*

## **ВПЛИВ КЛАСТЕРНИХ СПОЛУК РЕНІЮ З ОРГАНІЧНИМИ ЛІГАНДАМИ НА АКТИВНІСТЬ ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ**

Досліджено вплив кластерних сполук ренію на активність глюкозооксидази *in vitro*. Показано залежність інтенсивності взаємодії кластерних сполук ренію з білками від концентрації та структури сполуки. Кластерні сполуки ренію з органічними лігандами безпосередньо взаємодіють із білковими молекулами: активність глюкозооксидази достовірно змінюється на 4–24 %. Кластерна сполука ренію з ГАМК як ліганду знижує активність глюкозооксидази, а сполуки ренію з гідрофобними радикалами як лігандами здатні підвищувати активність ферментів, що свідчить про різні механізми взаємодії кластерних сполук ренію з ферментами.

Ю. С. Воронкова, Н. И. Штеменко

*Днепрпетровский национальный университет им. Олесь Гончара*

## **ВЛИЯНИЕ КЛАСТЕРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РЕНИЯ С ОРГАНИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ НА АКТИВНОСТЬ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ**

Исследовано влияние кластерных соединений рения на активность глюкозооксидазы *in vitro*. Установлена способность исследуемых соединений рения оказывать влияние на активность оксидазы в зависимости от структуры соединения и времени инкубации: активность глюкозооксидазы изменяется на 4–24 %. Кластерное соединение рения с ГАМК в качестве лиганда снижает активность глюкозооксидазы, а соединения рения с гидрофобными радикалами в качестве лигандов способны повышать активность, что свидетельствует о разных механизмах взаимодействия кластерных соединений рения с ферментами.

Y. S. Voronkova, N. I. Shtemenko

*Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University*

## **INFLUENCE OF CLUSTER RHENIUM COMPOUNDS WITH ORGANIC LIGANDS ON ACTIVITY OF GLUCOSE OXIDASE**

Influence of cluster rhenium compounds with different ligands on the activity of glucose oxidase was studied. Ability of the rhenium compounds to influence on the enzyme's activity was ascertained. It is depended on the compound structure and the time of incubation: activity of the glucose oxidase changed by 4–24 %. The cluster compound with GABA ligand reduced the enzymatic activity, but compounds with hydrophobic ligands increased the activity of glucose oxidase. Different mechanisms of the cluster rhenium compound–enzyme interactions are suspected.

### **Вступ**

Дослідження взаємодії металоорганічних сполук із ферментами має значний практичний і теоретичний інтерес, оскільки торкається таких важливих аспектів протео-

міки як транспорт, токсичність, механізм дії, індукція або гальмування активності та інші питання, пов'язані з упровадженням лікарських препаратів, розроблених на основі сполук металів [2; 15–17; 19; 20; 22–23].

У наших попередніх працях в експериментах *in vivo* та *in vitro* показано, що кластерні сполуки ренію з органічними лігандами виявляють протипухлинну, антигемолітичну та антирадикальну дію та є біохімічними модуляторами цисплатину, тобто посилюють його дію з одночасним зниженням токсичності [1; 10; 24–27]. Показано здатність кластерних сполук ренію впливати на взаємодію антиген – антитіло [8; 9; 24] та на активність фосфатаз [3]. Проте механізм взаємодії сполук ренію з найважливішими біополімерами живої клітини – білками вивчено недостатньо. Особливо цікавим питанням є можливий безпосередній вплив кластерів ренію на систему оксидаз. Отже, мета цієї роботи – з'ясувати вплив кластерних сполук ренію різної структури на активність глюкозооксидази.

### Матеріал і методи досліджень

Досліджували такі сполуки ренію:  $Re_2(CH_3COO)_2Cl_4 \cdot 2H_2O$  – Re1 – бісакватетрахлориди- $\mu$ -ацетатодиреній (III);  $Re_2(i-C_3H_7COO)_4Cl_2$  – Re2 – дихлоротетра- $\mu$ -ізутиратодиреній (III); цис- $[Re_2(GABA)_2Cl_3]Cl \cdot H_2O$  – Re3 – цис-тетрахлориди- $\mu$ - $\gamma$ -амінобутиратодиреній (III) хлорид, які готували в Українському державному хіміко-технологічному університеті на кафедрі неорганічної хімії [8; 11; 25; 26].

Об'єкт для проведення дослідження – двокомпонентна ферментна система – глюкозооксидаза-пероксидаза [6; 14], яка складається з розчинів ензимів: пероксидази та  $\beta$ -глюкозооксидази. Зміни активності оксидази від часу інкубування досліджували, використовуючи метод визначення глюкози у біологічних рідинах глюкозооксидазним методом, який базується на тому, що глюкоза за присутності глюкозооксидази окиснюється киснем повітря до глюконової кислоти та перекису водню, який за присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназином з утворенням хіноніміну червоно-фіолетового забарвлення; останній визначається фотометрично при довжині хвилі 540 нм [5]. Для проведення дослідження готували водні розчини сполук ренію Re1, Re2 та Re3 у діапазоні концентрацій від  $10^{-6}$  до  $10^{-10}$ . Досліди проводили після попередньої інкубації сполук ренію з оксидазою (+37 °C). Для кожної концентрації проводили чотири серії вимірювань, які розрізнялися за часом інкубації оксидази з кожним комплексом ренію: у пробірці першої серії глюкозу додавали через 10 хвилин, другої – через годину, третьої – через 2 години, четвертої – через 3 години після додавання досліджуваних комплексів. Активність ферментативних реакцій вимірювали протягом хвилини. Через хвилину додавали до робочого розчину 0,02 мл 10 мМ глюкози.

Як контроль використовували розчин глюкози, який не містив кластерних сполук ренію з органічними лігандами. Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи *t*-критерій Стьюдента. Вірогідним вважали результат, якщо  $p < 0,05$  [13].

### Результати та їх обговорення

Кластерні сполуки ренію з органічними лігандами впливають на активність глюкозооксидази (табл. 1). Існує залежність активації ферментної системи від часу інкубації зі сполуками ренію. У цьому відношенні між реній-ацетатними (Re1) та реній-ізутиратними (Re2) сполуками можна відмітити значну подібність у активації досліджуваної оксидази: відбувається зростання показника, що вивчається, до часу інкубації 2 години, а після 3 годин інкубації відмічали зниження активності при застосуванні комплексу Re1 в концентрації  $10^{-6}$  до значень, менших за контрольний показник.

Для системи Re2 також виявлено подібну залежність, однак навіть після 3 годин інкубації активність системи залишається вищою за показник контролю на 4–9 %.

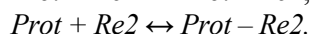
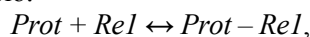
Таблиця 1

Активність глюкозооксидази при інкубації з досліджуваними комплексами ренію (моль/л)

Час інкубації, години	Контроль	Re1			Re2			Re3		
		10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-10</sup>
0,15	0,085 ± 0,004	0,082 ± 0,004	0,102 ± 0,005	0,088 ± 0,004	0,092 ± 0,005	0,096* ± 0,005	0,091 ± 0,005	0,056 ± 0,003	0,041 ± 0,002	0,064 ± 0,003
1	0,085 ± 0,004	0,091 ± 0,005	0,106* ± 0,005	0,098* ± 0,005	0,091 ± 0,005	0,094 ± 0,005	0,092 ± 0,005	0,067* ± 0,003	0,045* ± 0,003	0,068* ± 0,003
2	0,085 ± 0,004	0,089 ± 0,003	0,102* ± 0,005	0,091 ± 0,005	0,088 ± 0,004	0,094 ± 0,005	0,090 ± 0,005	0,050 ± 0,002	0,052* ± 0,003	0,053* ± 0,003
3	0,085 ± 0,004	0,082 ± 0,004	0,088 ± 0,004	0,086 ± 0,004	0,090 ± 0,005	0,093 ± 0,005	0,089 ± 0,003	0,044* ± 0,002	0,051* ± 0,003	0,061 ± 0,003

Примітка: \* – порівняно з контролем  $p < 0,05$  ( $n = 8$ ).

Отримані дані свідчать про зворотний механізм зв'язування кластерних сполук ренію з білками системи: спочатку утворюється щільніший комплекс білок – Re1 та білок – Re2. Але реакція має зворотній механізм, тобто реакція між білками (Prot) та сполуками ренію є рівноважною:



Із часом відбувається гідроліз сполук ренію Re1 та Re2 [11], отже рівновага зсувається у бік вільного ферменту. При концентрації сполук ренію 10<sup>-6</sup> сполуки ренію Re1 та Re2 майже не впливають на активність глюкозооксидази порівняно з контролем (рис. 1); активність зростає на 4–7 % для Re1 після одно- та двогодинної інкубації та на 3–8 % для Re2, а Re3 знижує активність оксидази удвічі порівняно з контролем.

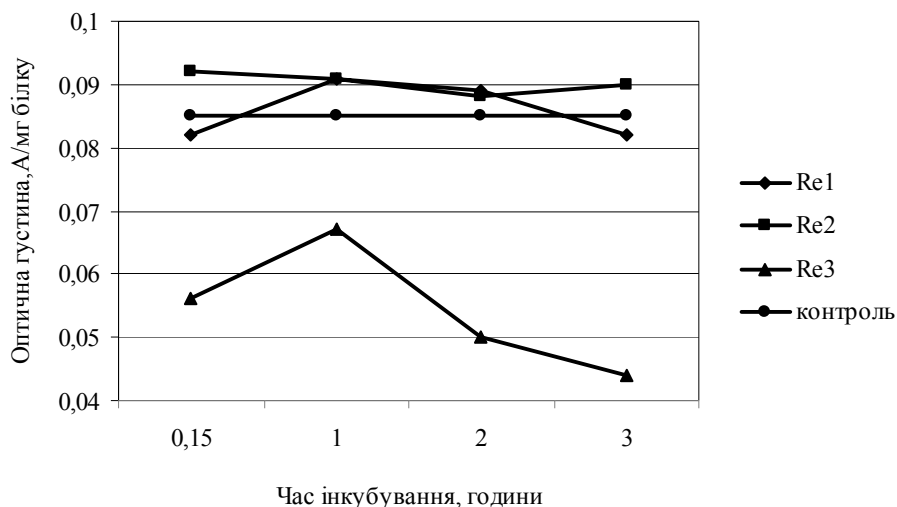


Рис. 1. Активність глюкозооксидази при інкубації зі сполуками ренію в 10<sup>-6</sup> М розчинах

При дослідженні сполук ренію при концентрації 10<sup>-8</sup> відмічено (рис. 2), що активувальний вплив належить комплексу ренію Re1: після однієї години інкубації його активність зростає на 24 %, а вже після трьох годин відбувається зниження показників до рівня контролю, що може бути пояснено зворотним зв'язуванням комплексу з ак-

тивним центром глюкозооксидази, в якому розташовані залишки гістидину [12; 21]. Для Re2 показано незначне збільшення активності (на 12 %) після 15 хвилин інкубації та поступове зниження активності (на 9 %) порівняно з контролем. При дослідженні Re3 показано, що з часом інкубації активність зростає, що може бути доказом незворотного зв'язування комплексу ренію з молекулою білка.

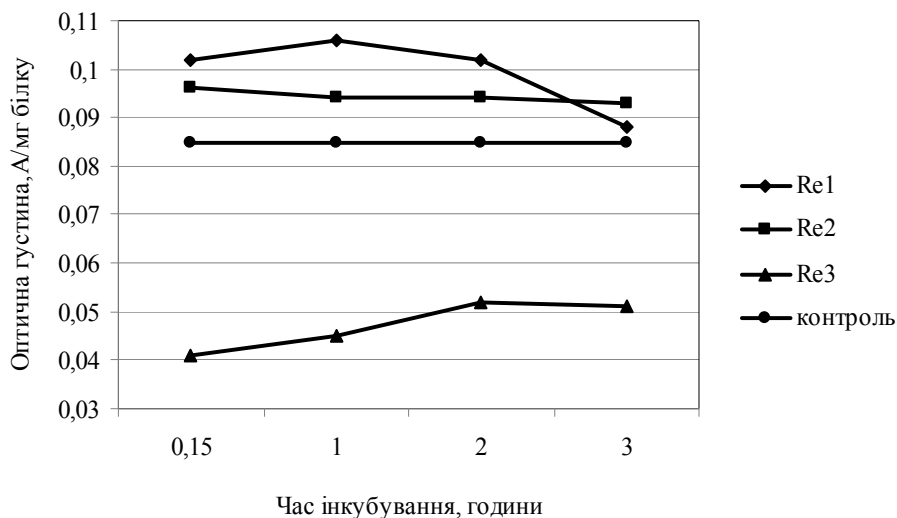


Рис. 2. Активність глюкозооксидази при інкубації зі сполуками ренію в  $10^{-8}$  М розчинах

Активність глюкозооксидази залежно від часу інкубації та концентрації  $10^{-10}$  М комплексів Re1 та Re2 також практично не змінюється порівняно з контролем (рис. 3). Відмічене збільшення активності для Re1 після одно- та двогодинної інкубації на 7–15 % порівняно з контролем, але вже після трьох годин показник сягає значень контролю. Ідентичну картину відмічено і для Re2: після однієї години інкубації зареєстроване збільшення на 8 % порівняно з контролем, а після трьох годин показник досяг значень контролю. Все це підтверджує припущення щодо механізму взаємодії кластерних сполук ренію з органічними лігандами білками.

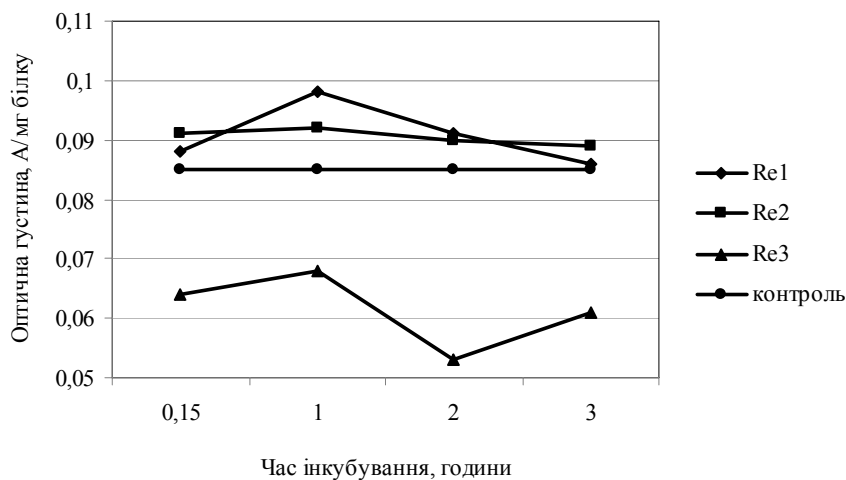


Рис. 3. Активність глюкозооксидази при інкубації зі сполуками ренію в  $10^{-10}$  М розчинах

Активувальна дія пригнічується разом із ліпофільністю радикала. В усіх випробуваних концентраціях комплексів (окрім Re3) максимальну активність спостерігали після одноденної інкубації (7–24 %). Після дво- та триденної інкубації активація ферментів зменшувалася: для Re1 зменшення зареєстроване для всіх концентрацій, для Re2 – для концентрацій  $10^{-8}$  та  $10^{-10}$  моль/л, для Re3 – в усіх досліджуваних концентраціях відмічене зниження активності майже удвічі порівняно з контролем.

Проаналізувавши залежність впливу Re3 на активність системи досліджуваних ферментів, можна сказати, що ця реакція практично незворотна. Оскільки в Re1 та Re2 лігандів, що оточують кластерний фрагмент, є гідрофобні радикали, можна припустити, що ці сполуки реагують із гідрофобними залишками амінокислот, що значно не впливає на конформацію активного центру оксидоредуктаз та їх активність. На відміну від Re1 та Re2, Re3 має позитивно заряджений радикал ГАМК. Ця кластерна сполука може реагувати з іоногенними амінокислотами, розташованими в активному центрі глюкозооксидази (залишки гістидину) [12; 21] та амінокислотами, розташованими в активному центрі пероксидази (гістидин і аргінін) [4; 13; 18]; або зв'язується з іоногенними амінокислотами глобули ферментів шляхом утворення іонних зв'язків, що, на відміну від гідрофобних взаємодій, значно змінює конформацію білків і негативно впливає на активні центри ферментів.

### Висновки

Кластерні сполуки ренію з органічними лігандами безпосередньо взаємодіють із білковими молекулами системи глюкозооксидази. Активність глюкозооксидази достовірно змінюється на 4–24 %. Кластерна сполука ренію Re3 знижує активність глюкозооксидази, а сполуки ренію Re1 та Re2 з гідрофобними радикалами здатні підвищувати активність ферментів, що свідчить про різні механізми взаємодії кластерних сполук ренію з ферментами.

### Бібліографічні посилання

1. **Антиокислювальна** активність біядерних комплексів ренію в експерименті *in vitro* / І. В. Пирожкова-Паталах, Н. І. Штеменко, О. А. Лихолат, І. І. Паталах // Питання біоіндикації та екології. – 2001. – Вип. 6, № 1. – С. 61–67.
2. **Взаємодіє** белков с соединениями платины и палладия, обладающими различной биологической активностью / Е. Н. Жмарева, Г. Д. Зегжда, Г. Б. Касьян, О. А. Ливенская // Укр. биохим. журн. – 1996. – Т. 68, № 3. – С. 74–79.
3. **Вплив** комплексних сполук диренію (III) на каталітичну активність фосфатаз / О. В. Берзєніна, Н. І. Штеменко, Ю. С. Воронкова та ін. // Вопросы химии и химической технологии. – 2007. – № 6. – С. 40–44.
4. **Газарян И. Г.** Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений / И. Г. Газарян, Д. М. Хушпульян, В. И. Тишков // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303–322.
5. **Горячковский А. М.** Пособие по клинической биохимии. – Одесса : ОКФА, 1994. – С. 255–258.
6. **Гульий М. Ф.** Фермент глюкозооксидаза и его применение. – К. : Наука, 1964. – 278 с.
7. **Дослідження** впливу кластерних сполук ренію на взаємодію антиген – антитіло методом імунодифузії за Ухтерлоні / Н. І. Штеменко, А. В. Штеменко, М. В. Горіла, Л. М. Александрова // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2002. – Вип. 10, т. 2. – С. 100–104.
8. **Єгорова Д. Є.** Взаємодія біядерних кластерів ренію (III) з фосфоліпідами та вищими карбоновими кислотами за формування мікрокапсул. Автореф. дис. ... канд. хім. наук; Держ. хім.-тех. ун-т. – Д., 2010. – 18 с.

9. **Закономірності** взаємодії антиген – антитіло у розчинах кластерних сполук ренію та цисплатину / М. В. Горіла, Т. М. Полішко, А. М. Аношко та ін. // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2009. – Вип. 17, т. 2. – С. 37–40.
10. **Изучение** влияния комплексов рения с органическими лигандами на кислотною резистентность эритроцитов человека / Н. И. Штеменко, И. В. Пирожкова-Паталах, А. В. Штеменко, А. А. Голиченко // Укр. биохим. журн. – 2000. – Т. 72, № 3. – С. 77–81.
11. **Изучение** процессов гидролиза биядерных кластерных соединений рения (*III*) различных структурных типов / Д. Е. Егорова, О. В. Берзенина, В. Г. Столяренко, А. В. Штеменко // Вопросы химии и химической технологии. – 2008. – № 1. – С. 27–31.
12. **Минаев Б. Ф.** Модели электронного строения флавопротеидов и механизм действия оксидаз / Б. Ф. Минаев, В. А. Минаева, В. Н. Лещенко // Биополимеры і клітина. – 2004. – Т. 20, № 3. – С. 224–232.
13. **Лакин Г. Ф.** Биометрия. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.
14. **Рогожин В. В.** Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. – СПб : ГИОРД, 2004. – 240 с.
15. **A thermodynamic** study on the binding of human serum albumin with new synthesized anticancer *Pd (II)* complex / G. R. Behbehani, A. Divsalar, A. A. Saboury et al. // Journal of Solution Chemistry. – 2008. – Vol. 37, N 12. – P. 1785–1794.
16. **Clarke M. J.** Ruthenium metallopharmaceuticals // Coordination Chemistry Reviews. – 2003. – Vol. 236. – P. 209–233.
17. **Effects** of human serum albumin in some biological properties of Rhodium (*II*) complexes / B. P. Esposito, E. de Oliveira, S. B. Zyngier et al. // J. Braz. Chem. Soc. – 2000. – Vol. 11, N 5. – P. 447–452.
18. **Howard R. A.** The interaction of Rhodium (*II*) carboxylates with enzymes / R. A. Howard, T. G. Spring, J. L. Bear // Cancer Research. – 1976. – Vol. 36. – P. 4402–4405.
19. **Jones C. J.** Medicinal applications of coordination chemistry / C. J. Jones, J. R. Thornback. – Cambridge, UK : RSC Publishing, 2007. – 353 p.
20. **Keppler B. K.** Anti-tumor properties of metal complexes / B. K. Keppler, E. A. Vogel // Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids – Bioinorganic Medicine. – 1995. – Vol. 2, p. 3. – P. 1200–1229.
21. **Prabhakar R.** A theoretical study of the dioxygen activation by glucose oxidase / R. Prabhakar, P. Siegbahn, B. F. Minaev // Biochem. Biophys. Acta. Bioenergetics. – 2003. – Vol. 1647. – P. 173–178.
22. **Reedijk J.** Medicinal application of heavy metal compounds // Curr. Opin. Chem. Biol. – 1999. – Vol. 3. – P. 236–240.
23. **Reversible** precipitation of bovine serum albumin by metal ions and synthesis, structure and reactivity of new tetrathiomallate chelating agents / V. E. Lee, J. M. Schulman, E. I. Stiefel et al. // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2007. – Vol. 101. – P. 1707–1718.
24. **Shtemenko N. I.** Interaction of Rhenium cluster compounds with human blood proteins / N. I. Shtemenko, M. V. Gorelaya, L. M. Alexandrova // Metal Ions in Biology and Medicine. – 2002. – Vol. 7. – P. 34–36.
25. **Shtemenko A. V.** Synthesis of novel tetracarboxylato dirhenium (*III*) compounds and crystal structure of them / A. V. Shtemenko, A. A. Golichenko, K. V. Domasevitch // Z. Naturforsch. – 2002. – Vol. 56b. – P. 381–385.
26. **Shtemenko N. I.** Dichlorotetra-*m*-isobutiratodirhenium (*III*): Enhancement of cisplatin action and RBC-stabilizing properties / N. I. Shtemenko, P. Collery, A. V. Shtemenko // Anticancer Research. – 2007. – Vol. 27, N 4. – P. 2487–2492.
27. **Synthesis**, characterization, *in vivo* antitumor properties of the cluster rhenium compound with GABA ligands and its synergism with cisplatin / A. V. Shtemenko, P. Collery, N. I. Shtemenko et al. // Dalton Trans. – 2009. – Vol. 26. – P. 5132–5136.

Надійшла до редакції 21.03.2011